

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01881

研究課題名(和文) 運動介入による骨髄微小環境(ニッチ)再構築と脳可塑性の連関

研究課題名(英文) Exercise intervention improves bone marrow niche and endothelial progenitor cell defects in stroke

研究代表者

丹羽 淳子(NIWA, Atsuko)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：60122082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳卒中を自然発症する重症高血圧症動物モデル(SHRSP)を用いて病態進行と骨髄血管性ニッチの動的変化を検討し、骨髄造血系の制御が血管病の治療標的となり得るか検討した。また運動介入が血管性ニッチ改善に寄与するか検討した。発症期の血管性ニッチでは内皮細胞が障害され、幹細胞の生存・保持に重要なSDF-1産生能や低酸素環境の劣化、骨髄球増加とCD34+血球・血管系幹(前駆)細胞の減少を認めた。運動は骨髄内皮細胞と間葉系細胞を維持し、全身性炎症反応を改善し、CD34+細胞の増殖・骨髄内保持と動員を促進した。発症後ニッチ細胞のFGF-2産生が増加し、血管性ニッチ再構築と造血系制御に関与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳卒中に至る過程で骨髄ジヌソイド血管内皮細胞は形態的および機能的に劣化した。骨髄血管内皮細胞は、血球・血管系幹細胞/前駆細胞の重要なニッチ細胞の一つであり、血管病における炎症性白血球の増多と組織血管内皮細胞の修復能低下を介して内皮機能障害に関与する可能性がある。運動介入は、骨髄血管系内皮細胞と間葉系細胞の血管性ニッチを改善し、造血系細胞分化と増殖の制御や血球・血管系幹細胞/前駆細胞の増殖と骨髄内の保持の制御、また末梢への動員を促進した。これは、身体活動による生体の内在的な修復能を介した臓器連関の活性化と骨髄内皮細胞・造血系幹細胞の相互作用の制御が慢性炎症性血管病の治療標的となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow (BM) endothelial phenotypes were shaped by stroke. As BM endothelial cells are an important component of BM niche, alterations of endothelial cells influence BM stem cell function. Stroke-prone hypertensive rats impaired hypoxia condition and sinusoidal vessels after stroke. BM endothelial and mesenchymal stromal cells impaired the production of SDF-1 and FGF-2, leading to decrease CD34+ hematopoietic progenitor cell (HSPC) activity (decreasing retention, proliferation and mobilization). Exercise induced niche remodeling in association with the increased production of SDF-1 and FGF and regulates the retention and differentiation of HSPC, followed retraction of HSPC pool. Inflammatory myelopoiesis and endothelial dysfunction (including repair impairment) driving chronic inflammation are propelled by alterations of the hematopoietic niche. Cross talk between BM endothelia and stem cells is a potential target for the development of anti-inflammatory cerebrovascular treatment.

研究分野：薬理学

キーワード：CD34+ 血球・血管系前駆細胞 骨髄微小環境(ニッチ) 血管内皮細胞 運動 低酸素 炎症 脳卒中 血管新生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 中枢神経の可塑性と運動介入：

近年の臨床および基礎研究から日常の運動習慣や脳傷害後のリハビリテーションが脳血管疾患の予防や治療に有効であることが明らかになってきた。これらの知見は、脳に可塑性のあること、また**身体活動によって生み出みだされる生体が内在する修復機構**が存在することを示唆している。しかしながら、その普遍的な自己修復力の実体や作用機序は明らかではない。

### (2) 骨髄微小環境 (ニッチ) と骨髄由来血球・血管系幹細胞/前駆細胞：

骨髄幹細胞/前駆細胞の増殖・分化は幹細胞周囲の細胞や分子 (**微小環境：ニッチ**) によって制御される。**骨髄血管内皮細胞**は重要な**ニッチ細胞**の一つであり、近接する**間葉系細胞**とともに幹細胞の生存・静止期維持・骨髄内保持の制御に必須の **SDF-1/CXCL12** (stromal cell-derived factor 1) を産生する。一方、骨髄は造血・免疫・代謝など多種の生体システムが集合する場であり、生体の情報はこれらの血管内皮細胞を通して骨髄細胞に伝達され、**組織恒常性**の維持あるいは破綻、修復リモデリングに関与していると考えられている。

また**骨髄由来 CD34 陽性幹細胞/前駆細胞**は、血球系/血管内皮細胞のホメオスタシス維持に関与し、CD34 陽性細胞の投与の有効性が臨床治験や動物実験で報告されている。

## 2. 研究の目的

(1) **骨髄ニッチ機能の劣化**を通して**造血システムの恒常性破綻**と**組織血管内皮細胞修復機能**低下がもたらされるのか、重症の**高血圧症**から**脳卒中**を自然発症する**慢性炎症病態モデル動物**を用いて骨髄ニッチの変化を**時系列的**に解析し、血管病と骨髄ニッチ機能について検討する。

(2) **骨髄由来循環 CD34 陽性細胞**の増加と活性化に相関して脳傷害病変部の血管新生と神経新生が促進されることから、**骨髄ニッチの制御**と**脳可塑性の連関**について検討する。

(3) **運動介入**がいかに**骨髄ニッチを再構築**して、血球/血管系幹細胞の維持と分化の制御に関与するのか骨髄ニッチの動的変化を解析し、脳血管疾患の**治療標的**としての可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) **動物実験と幹細胞ニッチの解析**：重症高血圧症と脳卒中を自然発症する脳卒中易発症性高血圧ラット SHRSP/Kpo (Stroke-prone spontaneously hypertensive rat) を血圧上昇前 5 週齢より回転装置付きケージ内で個別飼育し、自発的な運動をさせた (運動群)。これとほぼ同一面積の個別ケージで飼育した同腹個体を対照 (非運動群) とした。血圧、体重など生理学的測定と神経症状や認知機能試験の神経学的機能評価を継続して行い、脳卒中発症日の決定と脳神経系の再生能評価に用いた。

非運動群と運動群、両群の血圧上昇前、発症直前、発症後 1 日目から 7 日目までの骨髄・脳・脾臓組織をとり、骨髄血管性ニッチの組織学的構築と臓器組織を免疫染色や超微細形態観察から比較解析した。また骨髄細胞と臓器組織の内皮細胞機能、代謝機能など生化学的検討をおこなった。骨髄細胞のニッチ因子の産生量の測定から発症と運動介入による恒常性の破綻と維持に係る骨髄ニッチ因子の特性を解析した。末梢血中の白血球画分と血漿について、フローサイトメトリーと ELISA 法によりニッチ因子と全身性の炎症性反応の進展経過について解析した。

ニッチ機能の評価として、ニッチ因子産生量に加え、骨髄ジヌソイド血管系の形態学的計測と血流量、低酸素環境、骨髄細胞の ROS (活性酸素種) 産生、細胞周期、老化について解析した。

(2) **血管性ニッチの制御と構築**：骨髄幹細胞の静止期維持や生存の制御に必須のニッチ因子 SDF-1 組換え体を脳卒中発症後に投与して、血管性ニッチが病態に与える効果について解析した。

(3) **骨髄細胞の増殖と分化** : BrdU(bromodeoxyuridine)を飲水投与して細胞にとりこませ、フローサイトメトリーと免疫染色により骨髄細胞の増殖と分化能について検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) **脳卒中易発症性高血圧ラット (SHRSP) の高血圧進展と慢性炎症、運動介入による改善効果**

高血圧症の進展に伴い、SHRSP 末梢血は白血球増多、単球・好中球の炎症性骨髄球産生増加と活性化が顕著に表れ、末梢組織では若齢より微小血管の血栓症や慢性的な腎障害を生じた。また循環骨髄由来 CD34 陽性(+) VEGFR2 陽性(+) 血管内皮前駆細胞数の減少と遊走活性の低下が認められた。これらの結果から、全身性の炎症、血管炎症の進展は、骨髄造血系システムの恒常性の破綻と血管内皮細胞の内在性修復機能の低下を反映していると考えられた。

一方、この SHRSP に自発的運動介入を行うと、全身性の炎症性反応は抑制され、血管内皮機能も回復した (図 1)。脳卒中発症は遅延し、有意な延命効果を認めた。

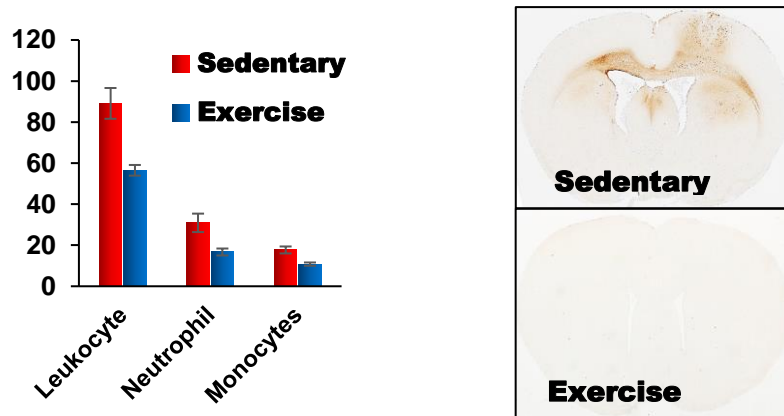


図 1 SHRSP 末梢血骨髄球(x102/μl)の増加(左)と脳血管内皮細胞透過性(IgG)の亢進(右)

##### (2) **造血系・血管系幹細胞を制御する骨髄ニッチの動的変化**

CD34+血管内皮前駆細胞は造血幹細胞と同一起源をもち、分化して血管内皮細胞の内在性修復機能に関与すると考えられている。骨髄ニッチは、複数の細胞からなる複合体であるが、我々は時系列の免疫組織学的検討から、特徴的類洞構造をもつジヌソイド血管内皮細胞とそれに近接する SDF-1 高発現間葉系細胞の血管性ニッチの変化が顕著であることに着目し、ジヌソイド血管性ニッチについて、ニッチ細胞、ニッチ因子、CD34+細胞の動的変化を解析した。

幹細胞の静止期維持や骨髄内保持の制御に重要な SDF-1 を高発現する SDF-1+細胞と CD34+細胞の発症前後の非運動・運動両群の変化を示した (図 2)。非運動 SHRSP では、骨髄ニッチの低酸素環境が劣化し、ジヌソイド内皮細胞の障害、血管ネットワーク構築の抑制を認めた。また SDF-1 ニッチ細胞減少と一致して CD34+細胞数は減少した。一方、運動 SHRSP のニッチ構造は維持されて CD34+細胞が増加し、ミトコンドリア由来活性酸素産生量が減少していた。ニッチ因子の産生量を時系列で測定したところ、運動介入により SDF-1 は発症前より正常血圧 Wistar ラットと近値のほぼ一定値を示し、発症後は FGF-2, VEGF の産生量が発症後時系列と並行して増加した (図 3)。また SDF-1, FGF-2, VEGF の転写因子である Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ /2 $\alpha$  の発現と活性も運動群で高値を示した。発症後から運動介入した群においても FGF-2 産生量は増加した。

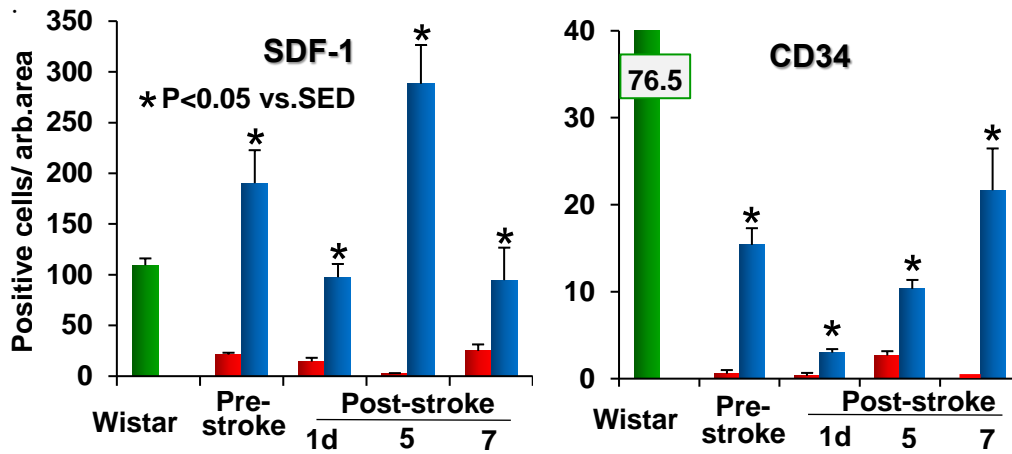


図2 非運動 SHRSP と運動 SHRSP の骨髄 SDF-1 陽性細胞数と CD34 陽性細胞数

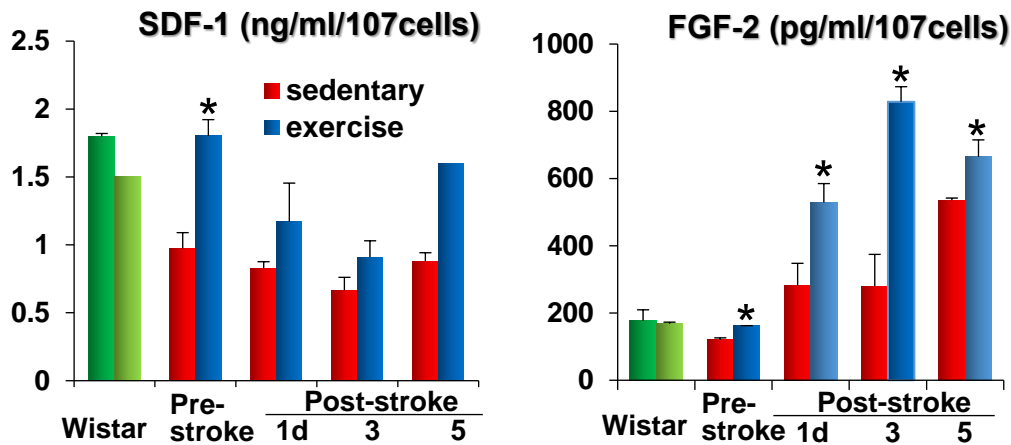


図3 非運動 SHRSP と運動 SHRSP の骨髄 SDF-1 産生量と FGF-2 産生量

### (3) 骨髄ジヌソイド血管内皮細胞

ジヌソイド内皮細胞は、幹細胞の静止期の制御とともに、末梢組織や循環系シグナルを受け、前駆細胞の増殖・分化、また末梢へ骨髄由来細胞を動員して恒常性維持や修復過程を制御すると考えられている。

内皮細胞の微細形態観察によって、非運動ラットニッチでは、ジヌソイド内皮細胞の空胞形成や基底膜の断裂、バリアー能（アルブミンは通すが IgG は通過しない）の低下を認めた。これに対し、運動ラットでは、血管長と面積の拡張や分岐数の増加、血流量の増加を示した。内皮細胞の構造とバリアー機能は保たれ血管系が維持された。血管周囲間葉系細胞数も増加した(図4)。

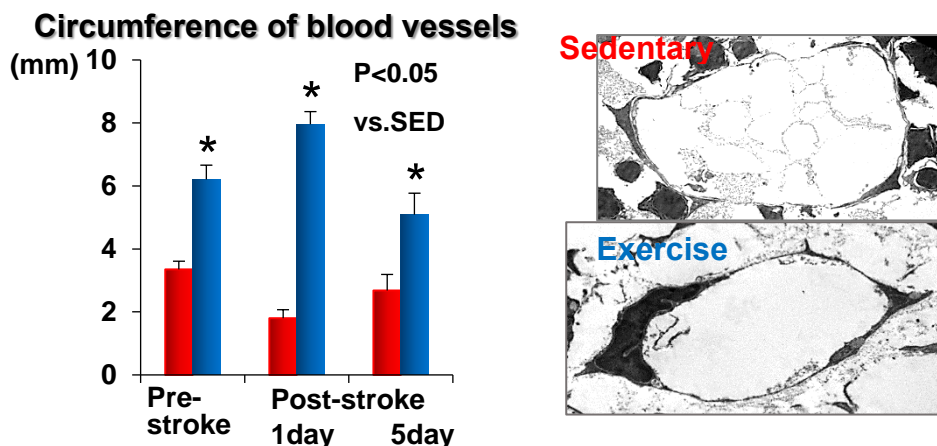


図4 骨髄ジヌソイド血管ニッチの血管周囲長(左)と発症5日目の内皮細胞の微細形態(右)

#### (4) 骨髄細胞の増殖と分化・老化

発症前に BrdU (bromodeoxyuridine) を 14 日間の飲水投与し、その後 14 日間の休薬期を設けた実験系で BrdU で標識された骨髄細胞は、両群とも発症前では約 80% が G1/G0 期を示し、発症後速やかに S 期細胞が増加した。一方、BrdU 陽性細胞の割合は、運動 SHRSP では発症後も骨髄に多数存在したのに対し、非運動ラットの BrdU 陽性細胞は著減していた。また非運動 SHRSP の間葉系細胞に p16 や  $\beta$  ガラクトシダーゼ陽性の老化マーカー発現細胞が増加した。DNA 損傷は発症後も検出されなかった。

#### (5) 血管性ニッチの制御

非運動 SHRSP の血管性ニッチで産生量が低下していたニッチ因子 SDF-1 の組換え体を発症後連続投与し、血管性ニッチの制御と脳病変部の再生について検討した。

SDF-1 投与により形態学的骨髄血管性ニッチ構造は維持され、間葉系細胞数、CD34+細胞数が対照群に比し増加した。ニッチ因子の産生量も増加した。SDF-1 投与 SHRSP の脳病変部と側脳室では、CD34+細胞の血管新生と Nestin や DCX (doublecortin) 陽性神経新生が有意に増加した (図 5)。病変部の再生に一致して、SDF-1 投与群では対照群に比し、有意な延命効果を認めた。

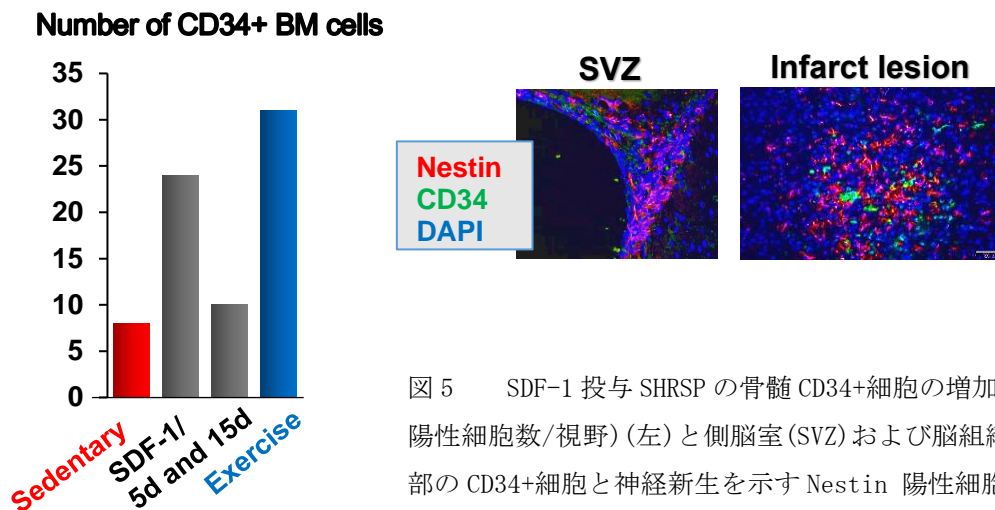


図 5 SDF-1 投与 SHRSP の骨髄 CD34+細胞の増加 (平均陽性細胞数/視野) (左) と側脳室 (SVZ) および脳組織病変部の CD34+細胞と神経新生を示す Nestin 陽性細胞 (右)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hanasaki S, Kobori T, Yamazaki Y, Kitaura A, Niwa A, Nishinaka T, Nishibori M, Mori S, Nakao S, Takahashi H	4. 巻 8
2. 論文標題 Effects of scavenger receptors-1 class A stimulation on macrophage morphology and highly modified advanced glycation end product-protein phagocytosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 5901
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-24325-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kobori T, Hamasaki S, Kitaura A, Yamazaki Y, Nishinaka T, Niwa A, Nakao S, Wake H, Mori S, Yoshino T, Nishibori M, Takahashi H	4. 巻 9
2. 論文標題 Interleukin-18 Amplifies Macrophage Polarization and Morphological Alteration, Leading to Excessive Angiogenesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 334
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2018.00334. eCollection 2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nishinaka T, Yamazaki Y, Niwa A, Wake H, Mori S, Yoshino T, Nishibori M, Takahashi H	4. 巻 -
2. 論文標題 Alterations of lymphocyte count and platelet volume precede cerebrovascular lesions in stroke-prone spontaneously hypertensive rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomarkers	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/1354750X.2020.1750703	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 西中 崇、山崎 由衣、丹羽 淳子、森 秀治、和氣 秀徳、西堀 正洋、高橋 英夫
2. 発表標題 マクロファージによる終末糖化産物の取り込みに対する硫酸化多糖類の影響
3. 学会等名 第134回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎 由衣、西中 崇、丹羽 淳子、森 秀治、和氣 秀徳、西堀 正洋、高橋 英夫
2. 発表標題 Advanced glycation end products による血管新生促進機序の解明
3. 学会等名 第134回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Niwa A, Akahoshi Y, Nishinaka T, Takahashi H
2. 発表標題 Exercise intervention improves bone marrow niche and endothelial progenitor cell defects in stroke
3. 学会等名 18th WORLD CONGRESS OF BASIC AND CLINICAL PHARMACOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hamasaki S, Kobori T, Kitaura A, Yamazaki Y, Nishinaka T, Niwa A, Nakao S, Nishibori M, Takahashi H
2. 発表標題 Visualizatiion of advanced glycatiion end products phagocytosis by macrophages and identification of possible receptor
3. 学会等名 18th WORLD CONGRESS OF BASIC AND CLINICAL PHARMACOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Teshigawara K, Niwa A, Wake H, Liu K, Mori S, Takahashi H, Nishibori M
2. 発表標題 Characterization of histidine-rich glycoprotein (HRG) production under the experimental pathological conditions
3. 学会等名 18th WORLD CONGRESS OF BASIC AND CLINICAL PHARMACOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishinaka T, Kobori T, Hamasaki S, Kitaura A, Niwa A, Mori S, Nishibori M, Takahashi H
2. 発表標題 Screening of sulfated polysaccharide and sugar-related compounds as the regulator of advanced glycation end-products by macrophages
3. 学会等名 18th WORLD CONGRESS OF BASIC AND CLINICAL PHARMACOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamazaki Y, Kobori T, Niwa A, Nishinaka T, Mori S, Nishibori M, Takahashi H
2. 発表標題 Interleukin-18 amplifies M2 polarization of macrophage which leads excessive angiogenesis
3. 学会等名 18th WORLD CONGRESS OF BASIC AND CLINICAL PHARMACOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Niwa A, Akahoshi Y, Horiuchi Y, Nishinaka T, Takahashi H
2. 発表標題 FGF signaling promotes bone marrow niche remodeling in post-stroke recovery
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishinaka T, Niwa A, Wake H, Mori S, Nishibori M, Takahashi H
2. 発表標題 Alterations of lymphocyte count and platelet volume precede development of stroke-related symptoms in stroke-prone spontaneously hypertensive rats
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

近畿大学医学部薬理学教室  
<https://www.med.kindai.ac.jp/pharma/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	西中 崇  (NISHINAKA Takashi)  (50786184)	近畿大学・医学部・助教   (34419)	
研究 分担者	高橋 英夫  (TAKAHASHI Hideo)  (60335627)	近畿大学・医学部・教授   (34419)	
研究 分担者	小堀 宅郎  (KOBORI Takuro)  (60734697)	近畿大学・医学部・助教   (34419)	削除：2018年3月22日